

(12)特許協力条約に基づいて公開された国際出願

(19) 世界知的所有権機関  
国際事務局



(43) 国際公開日  
2002年10月31日 (31.10.2002)

PCT

(10) 国際公開番号  
WO 02/086160 A1

(51) 国際特許分類<sup>7</sup>: C12Q 1/68, C07D  
237/22, 498/04, C07H 19/04, 19/24, 21/04

浦垣俊孝 (URAGAKI, Toshitaka) [JP/JP]; 〒230-0053  
神奈川県横浜市鶴見区大黒町10番1号 三菱レイヨン  
株式会社 化成品開発研究所内 Kanagawa (JP).

(21) 国際出願番号: PCT/JP01/03322

(74) 代理人: 平木祐輔, 外 (HIRAKI, Yusuke et al.); 〒105-0001 東京都港区虎ノ門一丁目17番1号 虎ノ門  
5森ビル3階 Tokyo (JP).

(22) 国際出願日: 2001年4月18日 (18.04.2001)

(81) 指定国(国内): AE, AG, AL, AM, AT, AU, AZ, BA, BB,  
BG, BR, BY, BZ, CA, CH, CN, CO, CR, CU, CZ, DE, DK,  
DM, DZ, EE, ES, FI, GB, GD, GE, GH, GM, HR, HU, ID,  
IL, IN, IS, JP, KE, KG, KP, KR, KZ, LC, LK, LR, LS, LT,  
LU, LV, MA, MD, MG, MK, MN, MW, MX, MZ, NO, NZ,  
PL, PT, RO, RU, SD, SE, SG, SI, SK, SL, TJ, TM, TR, TT,  
TZ, UA, UG, US, UZ, VN, YU, ZA, ZW.

(25) 国際出願の言語: 日本語

(84) 指定国(広域): ARIPO 特許 (GH, GM, KE, LS, MW,  
MZ, SD, SL, SZ, TZ, UG, ZW), ユーラシア特許 (AM,  
AZ, BY, KG, KZ, MD, RU, TJ, TM), ヨーロッパ特許  
(AT, BE, CH, CY, DE, DK, ES, FI, FR, GB, GR, IE, IT,  
LU, MC, NL, PT, SE, TR), OAPI 特許 (BF, BJ, CF, CG,  
CI, CM, GA, GN, GW, ML, MR, NE, SN, TD, TG).

(26) 国際公開の言語: 日本語

(71) 出願人(米国を除く全ての指定国について): 三菱レイヨン株式会社 (MITSUBISHI RAYON CO., LTD.) [JP/JP]; 〒108-8506 東京都港区港南一丁目6番41号 Tokyo (JP). 株式会社 ジェノックス創薬研究所 (GENOX RESEARCH, INC.) [JP/JP]; 〒300-2635 茨城県つくば市東光台5-1-3 エーザイ株式会社 筑波研究所内 Ibaraki (JP).

添付公開書類:  
— 國際調査報告書

(72) 発明者; および  
(75) 発明者/出願人(米国についてのみ): 大塚雅巳 (OTSUKA, Masami) [JP/JP]; 〒862-0909 熊本県熊本市湖東1-4 湖東住宅3-303 Kumamoto (JP). 山崎哲郎 (YAMAZAKI, Tetsuro) [JP/JP]; 〒861-2108 熊本県熊本市昭和町19-1 Kumamoto (JP). 郡司善道 (GUNJI, Shigemichi) [JP/JP]; 〒140-0003 東京都品川区八潮五丁目10番55号509号室 Tokyo (JP). 湯不二夫 (YU, Fujio) [JP/JP]. 菊池克明 (KIKUCHI, Katsuaki) [JP/JP].

2文字コード及び他の略語については、定期発行される各PCTガゼットの巻頭に掲載されている「コードと略語のガイドスノート」を参照。

(54) Title: HYBRIDIZATION PROBES

(54) 発明の名称: ハイブリダイゼーションプローブ

(57) Abstract: In double-stranding by hybridization reactions with natural nucleic acids, use is made of probes containing a cytosine derivative which forms two hydrogen bonds specifically with guanine and/or a guanine derivative, which forms two hydrogen bonds specifically with cytosine. Thus, a number of hybridization reactions can be synchronously effected at once.

(57) 要約:

天然型核酸とのハイブリダイゼーション反応による二本鎖化において、グアニン塩基と特異的に2本の水素結合を形成するシトシン誘導体及び/又はシトシン塩基と特異的に2本の水素結合を形成するグアニン誘導体を含むプローブを利用する。これにより、多数のハイブリダイゼーション反応を一括・同調させて行うことができる。

WO 02/086160 A1

## 明 細 書

### ハイブリダイゼーションプローブ

#### 技術分野

本発明は、相補的一本鎖核酸同士の二本鎖核酸へのハイブリダイゼーション反応に適したプローブに関する。

#### 従来の技術

ハイブリダイゼーション反応とは、二本鎖核酸の変性及び相補鎖再会合特性に基づく反応である。このハイブリダイゼーション反応は、核酸の相補的な鎖の間で生じるため、核酸の精製や分析等に利用されている。

ハイブリダイゼーション反応を用いた分析は、基本的には、標的配列を含む被検試料を調製後、標識された標的の配列に相補的なプローブとハイブリダイゼーションさせ、標識プローブとハイブリダイズした標的配列をスクリーニングするものである。被検試料の調製方法、プローブ（クローン化 DNA あるいは合成核酸）の種類、標識法の違い、分析手段の種類等により、ハイブリダイゼーション反応を利用した分析法の種類及び／又は用途は多岐に渡る。

例えば、サザンハイブリダイゼーション法やノーザンハイブリダイゼーション法は、クローン化された遺伝子 DNA 等をプローブとして標識し、被検試料として各種組織、細胞由来遺伝子 DNA や mRNA を用い、相補もしくは類似遺伝子の存在を確認及び／又は定量する方法である。

PCR 法も、その基本部分は合成オリゴ DNA プライマーとのハイブリダイゼーション反応と DNA 複製反応の組み合わせである。

他に、ハイブリダイゼーション反応を利用した分析手法としては、特定多数の遺伝子が一括解析出来る DNA チップ法（あるいは DNA マイクロアレイ法）が開発され注目を集めている。DNA チップとは、1～数 cm<sup>2</sup> の平面基盤片上に、多数の DNA 断片がプローブとして高密度に整列固定化されたものであり、鎖長の揃ったオリゴ核酸が平板上に *in situ* で化学合成されたものや、天然由来の cDNA が固定されたものがある。いずれの DNA チップを用いた方法でも、研究対象細胞の発現遺伝子等を適当な方法で増幅、蛍光物質等で標識し、それらを平

面基盤片上に固定化されたプローブとハイブリダイゼーション反応後、チップ表面を高速レーザースキャナー等で測定し、数千～万におよぶ多種の遺伝子発現量を一括定量したり、検体間で発現量の相対比較を行ったりすることが出来る。オリゴ核酸の場合、特定の配列を持ったプローブセットを配することで、特定遺伝子上の変異を検出したり配列解析の目的に使用されることもある（SBH 法； Sequencing by Hybridization 法。Drmanac, R. et al. Genomics 4: 114-128 (1989), Drmanac, R. et al. Science 260: 1649-1652 (1993)）

### 発明が解決しようとする課題

ハイブリダイゼーション法により分析をする場合には、反応温度や塩濃度等のハイブリダイゼーション条件の違いにより、標的配列とどの程度ミスマッチした相補性のプローブがハイブリダイズするかが異なり、目的の緊縮度（ミスマッチを許す度合い）に応じ、ハイブリダイゼーション条件が設定されている。そして、このハイブリダイゼーション条件は、通常、プローブと標的配列との融解温度  $T_m$  を考慮して設定するが、 $T_m$  は、ハイブリダイゼーションを起こす領域の塩基組成、グアニン塩基(G)及びシトシン塩基(C)の含量に依存することが知られている。

ところが、DNA チップ法のように、多数のハイブリダイゼーション反応を一括して、同条件で行う必要がある場合は、不適当なプローブを除く以外には、プローブの GC 含量を揃えることしか有効な方法は存在しなかった。プローブの GC 含量を揃える場合には、対象とする遺伝子配列の中でもプローブとして利用出来る領域が極めて限られたものになってしまふという問題を有していた。

### 発明の開示

#### 課題を解決するための手段

本発明者らは、ハイブリダイゼーション反応で形成される 2 種のプリン：ピリミジン塩基対、即ち 3 本の水素結合によるグアニン：シトシン塩基対、及び 2 本の水素結合によるアデニン：チミン（RNA の場合ウラシル）塩基対において、塩基対間の結合特異性を損なわず水素結合本数を等しくする核酸塩基誘導体を用い

れば、プローブの塩基配列の違いに基づく融解温度  $T_m$  値等のハイブリダイゼーション特性値を均一化することが可能と考えた。本発明は、プローブの塩基配列を考慮することなく、多数のハイブリダイゼーション反応を一括して、同条件で行う方法を提供することを目的とする。

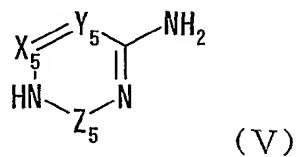
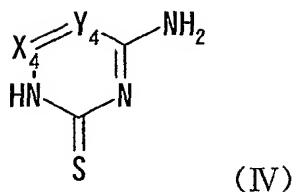
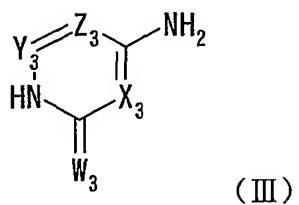
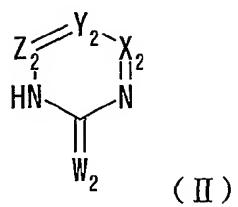
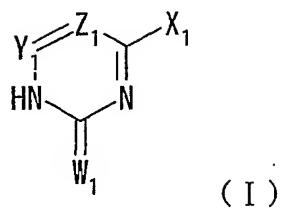
シトシン塩基と特異的に 2 本の水素結合を形成するグアニン誘導体、及びグアニン塩基と特異的に 2 本の水素結合を形成するシトシン誘導体を合成し、それらを含むプローブを使用することにより、一括して、同一条件でハイブリダイゼーション反応を実施することが可能となる。

#### 発明の実施の形態

以下、本発明を詳細に説明する。

本発明のプローブは、天然型核酸とのハイブリダイゼーション反応の際に二本鎖化に用いるプローブにおいて、グアニン塩基と特異的に二本の水素結合を形成するシトシン誘導体、及びシトシン塩基と特異的に二本の水素結合を形成するグアニン誘導体を含み、 $T_m$  値がハイブリダイゼーション条件として同一視できる程度に、実質上すべての塩基対が二本の水素結合によりハイブリダイゼーションすることを特徴とするプローブである。実質上全てとは、ハイブリダイゼーションする配列中の C G の内、望ましくは、80%以上、更に望ましくは、95%以上、更に好適には全ての C G が上記のグアニン誘導体又はシトシン誘導体に置換されていることが望ましい。

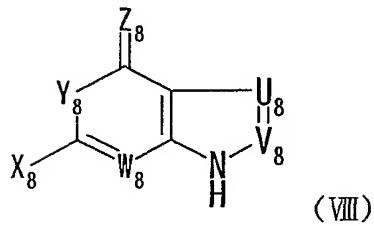
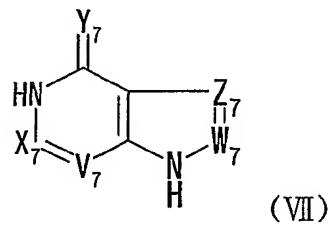
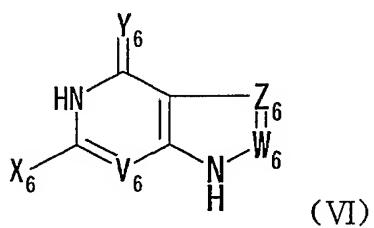
本発明において用いるシトシン誘導体は、以下の式 (I) ~ (V) のいずれかの式で表される化合物であり、シトシン中のグアニンと水素結合をする 3 つの部位（即ち、4 位のアミノ基、3 位の窒素、2 位のケトン）のうち、いずれか一つが水素結合できないような構造のものである。このような化合物としては、4 位のアミノ基との水素結合が阻害される式 (I) 及び式 (II) の化合物、3 位の窒素との水素結合が阻害される式 (III) の化合物、2 位のケトンとの水素結合が阻害される式 (IV) 及び (V) の化合物を例示することができる。

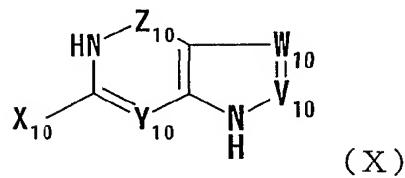
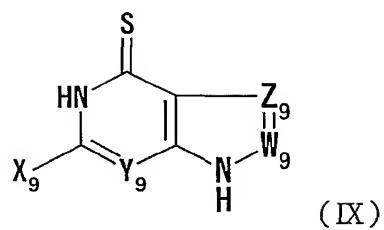


(式中、 $\text{X}_1$  は  $\text{NR}_2$ 、 $\text{NHAc}$ 、 $\text{R}$ 、 $\text{OR}$ 、 $\text{OAc}$ 、 $\text{SR}$ 、 $\text{SAC}$ 、 $\text{COR}$ 、 $\text{COOR}$ 、 $\text{CN}$ 、 $\text{F}$ 、 $\text{Cl}$ 、 $\text{Br}$ 、又は  $\text{I}$  を表し、 $\text{W}_1$ 、 $\text{W}_2$ 、及び  $\text{W}_3$  は  $\text{O}$ 、又は  $\text{NH}$  を表し、 $\text{X}_3$  は  $\text{CH}$ 、又は  $\text{CR}$  を表し、 $\text{Z}_5$  は  $\text{CH}_2$ 、又は  $\text{CHR}$  を表し、 $\text{Y}_1$ 、 $\text{Z}_1$ 、 $\text{X}_2$ 、 $\text{Y}_2$ 、 $\text{Z}_2$ 、 $\text{Y}_3$ 、 $\text{Z}_3$ 、 $\text{X}_4$ 、 $\text{Y}_4$ 、 $\text{X}_5$ 、及び  $\text{Y}_5$  は  $\text{CH}$ 、 $\text{CR}$ 、又は  $\text{N}$  を表す。但し、 $\text{R}$  はシトシン誘)

導体とグアニンとの間の 2 本の水素結合を阻害しない置換基を表す。)

また、グアニン誘導体は、以下の式 VI～X のいずれかの式で表される化合物であり、グアニン中のシトシンと水素結合をする 3 つの部位（即ち、2 位のアミノ基、1 位の窒素、6 位のケトン）のうち、いずれか一つが水素結合できないような構造のものである。このような化合物としては、2 位のアミノ基との水素結合が阻害される式 (VI) 及び式 (VII) の化合物、1 位の窒素との水素結合が阻害される式 (VIII) の化合物、6 位のケトンとの水素結合が阻害される式 (IX) 及び (X) の化合物を例示することができる。





(式中、 $X_6$ 、及び $X_8$ はNR2、NHAc、R、OR、OAc、SR、SAC、COR、COOR、CN、F、Cl、Br、又はIを表し、 $Y_6$ 、 $Y_7$ 、及び $Z_8$ はO、又はNHを表し、 $Y_8$ 、及び $Z_{10}$ はCH<sub>2</sub>、CHR、O、又はSを表し、 $X_9$ 、及び $X_{10}$ はNH<sub>2</sub>、又はOHを表し、 $V_6$ 、 $W_6$ 、 $Z_6$ 、 $V_7$ 、 $W_7$ 、 $X_7$ 、 $Z_7$ 、 $U_8$ 、 $V_8$ 、 $W_8$ 、 $W_9$ 、 $Y_9$ 、 $Z_9$ 、 $V_{10}$ 、 $W_{10}$ 、及び $Y_{10}$ はCH、CR、又はNを表す。但し、Rはシトシンとグアニン誘導体との間の2本の水素結合を阻害しない置換基を表す。)

これらシトシン誘導体及びグアニン誘導体は、常法に従って合成することができる。

本発明におけるプローブ主鎖は、ハイブリダイゼーションが起こるものであればその構造は限定されるものではないが、DNA、RNA、ペプチド核酸（糖リン酸エステル鎖を電荷のないペプチド鎖としたもの、J.Am.Chem.Soc.114, 1985(1992)）、LNAと呼ばれる核酸アナログ（核酸ヌクレオシドを構成するフイラノース環の2位の酸素と4位の炭素との間にメチレン架橋を導入したもの。Bioconjug. Chem. 11(2) 228-38 (2000)）を含むもの等が例示できる。また、プローブの調製は常法に従って、核酸自動合成装置や、自動ペプチド合成装置を用いて行うことが出来る。

本発明において、プローブセットとは、プローブの集合体を示す。プローブセ

ットは、検出の目的に応じて集合体を設定することができる。例えば、ガン関連遺伝子検出用のプローブ集合体、糖尿病関連遺伝子検出用のプローブ集合体、あるいは、微生物、酵母、植物等の生物種遺伝子検出用のプローブ集合体等を例示することができる。

本発明においてそれらプローブセットは、個々のプローブが識別可能となるよう、樹脂、ガラスビーズ、ゲル等の適当な担体にプローブ別に固定化される。また、基盤上に整列させて DNA チップとされる。

本発明においてハイブリダイゼーション反応の確認は、一般的に行われるような方法で行うことが出来る。例えば、プローブと相補的な DNA とのハイブリダイゼーションでは、温度を変化させながら紫外吸収を測定することでハイブリダイゼーションの有無を確認することが出来る。また、紫外吸収曲線の変極点から融解温度（Tm）を求めることができる。DNA チップ化したプローブ等の場合には次のようにして行うことが出来る。ある生物由来のサンプルから調製した mRNA から逆転写酵素によって cDNA を作成し、蛍光ラベル化する（以下、ラベル化検体）。このラベル化検体を、SSC バッファー中で 50～60℃で 10～20 時間、DNA チップ上でインキュベート、その後、洗浄操作を行って、マイクロアレイ用スキャナ等を使用してハイブリダイズしたスポットを検出することが出来る。

本発明のプローブは、DNA チップによる多量一括的な遺伝子発現解析及び検出の他、今後の重要性が指摘されている SNP 解析や、ハイブリダイゼーションによる遺伝子配列解析（SBH 法）等に用いることが可能である。

#### 実施例

以下、実施例により本発明をさらに具体的に説明する。しかし、本発明は必ずしもこれら実施例のみに限定されるものではない。

##### [実施例 1] 核酸型プローブの合成

(1) シトシン誘導体（デオキシリボース-6-アザ-3-デアザシトシン）ホスホロア

ミダイトの合成；

無水ヒドラジンとムコクロロ酸(mucochloric acid)を反応させ、ジクロロピリダジノンを合成する。アンモニアで4位クロロ基をアミノ化し化合物1を合成する。

化合物1(2.2g)のメタノール(90ml)-ジメチルホルムアミド(90ml)懸濁液に水酸化ナトリウム(0.604g)、10%パラジウム炭素(0.9g)を加え、水素ガス置換下、常圧で7日間攪拌する。パラジウム炭素を濾過し、反応溶媒を減圧留去する。得られた残渣を精製水で再結晶して化合物2(0.835g)を得る。

化合物2(1.0g)の無水ピリジン(50ml)懸濁液を、水浴で冷却し、アルゴンガス置換下、塩化ベンゾイル(2.09ml)を滴下する。アルゴンガス置換下、室温で1日攪拌した後、反応溶媒を減圧留去する。得られた残渣に精製水(10ml)を加え、4M 塩酸でpH1に調整する。析出結晶をろ取し、精製水で洗浄する。減圧乾燥後、その結晶に無水エタノール(10ml)を加え、10分間程煮沸する。10°Cまで冷却した後、結晶をろ取し、エーテルで洗い、化合物3; 6-アザ-デアザシトシン(1.399g)が得られる。

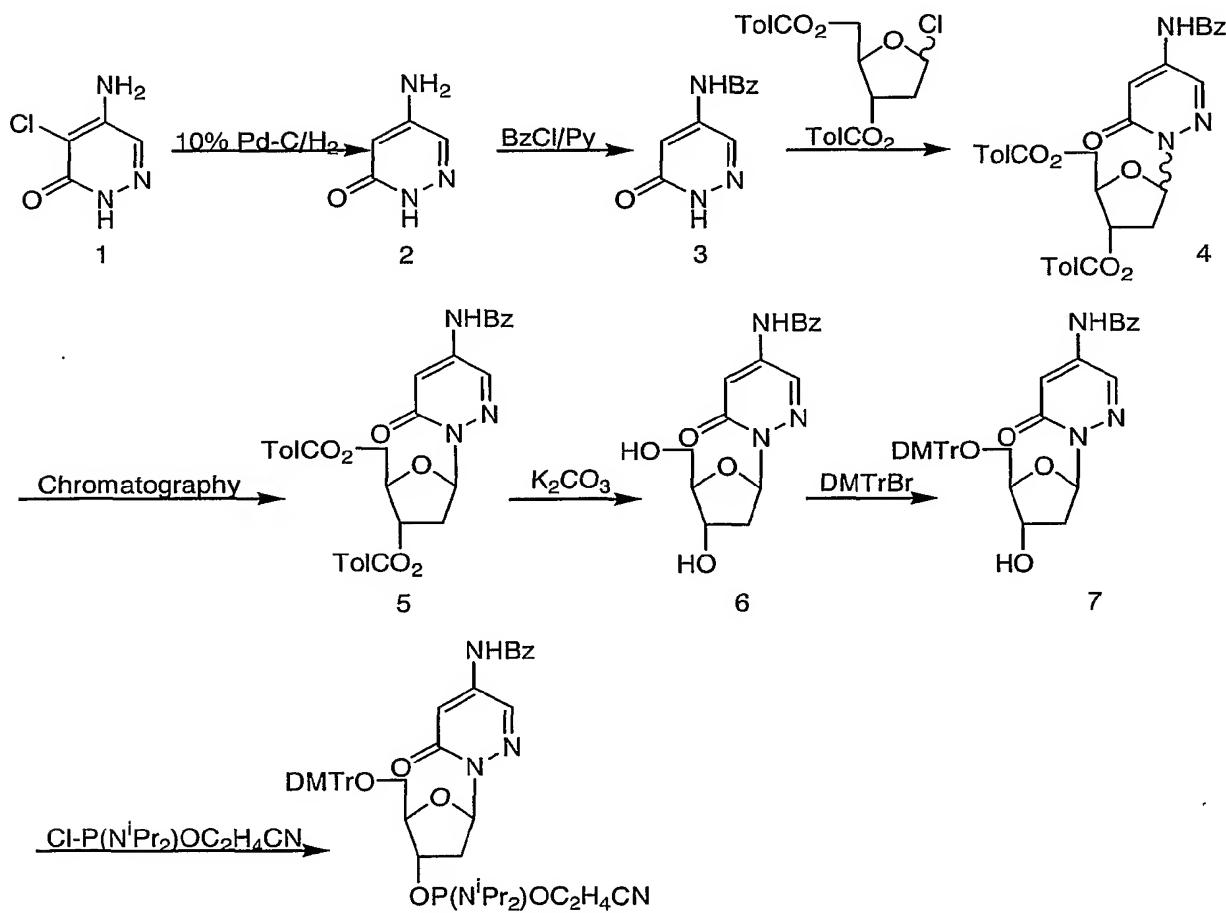
化合物3(1.00g)と炭酸カリウム(0.70g)のジメチルホルムアミド(12.9ml)懸濁液に、常法により別途合成した1-クロロデオキシリボースのp-トルオイル保護体(2.0g)を加え、アルゴンガス置換下、室温で2日間攪拌する。不溶物をろ去し、ろ液の反応溶媒を減圧留去する。得られた残渣に精製水(5ml)を加えた後、氷浴下、4M 塩酸(0.175ml)を加え、15分間攪拌する。結晶をろ取し、精製水で洗い $\alpha$ 及び $\beta$ 体の混合した化合物4(2.8g)が得られる。それを、Wakogel C-200 150gを充填したカラムクロマトグラフィーに供して、塩化メチレンと酢酸エチルの混合溶媒で分画し、 $\beta$ 体画分を集めて濃縮し、化合物5(1.2g)が得られる。

化合物5(1.0g)と炭酸カリウム(0.6g)のジメチルホルムアミド(11ml)懸濁液を混合し、30°Cで1時間攪拌する。不溶物をろ去し、ろ液を減圧濃縮する。得られた残渣に精製水(5ml)を加えた後、氷冷下、4M 塩酸(0.1ml)を加え、15分間攪拌する。結晶をろ取し、この析出結晶をメタノールで再結晶し化合物6(0.4g)が得られる。

この化合物6(0.3g)を無水ピリジンで減圧下共沸脱水した後、無水ピリジン(1ml)に溶解し臭化4,4'-ジメトキシトリチル(0.6g)を加え60°Cで攪拌する。

2時間後加熱を止め、室温に戻してから水(2ml)を加え、ジクロルメタン(2mlで2回)で抽出、乾燥、濃縮し残渣をトルエンで2回共沸し、ピリジンを完全に除く。トルエンを加え析出した結晶を洗浄し、減圧乾燥する事でトリチル保護体(化合物7)(0.5g)が得られる。

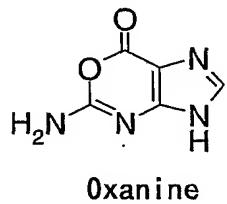
化合物7(0.4g)を、無水ピリジンと無水トルエンで各々2回減圧下共沸脱水した後、ジクロルメタン(5ml)に溶解し、ジイソプロピルエチルアミン(1.6ml)を加え0°Cに冷却し、クロロ-2-シアノエトキシジイソプロピルアミノホスフィン(0.3g)を加えて室温で攪拌する。1時間後ジクロルメタン(5ml)を加え、5%重曹水溶液(3ml)で2回洗浄、無水硫酸ソーダで乾燥、濃縮後残分をシリカゲルクロマトグラフィーで精製してデオキシリボース-6-アザ-3-デアザントシンホスホロアミダイト(0.5g)(化合物8)が得られる。



Bz:ベンゾイル基、Tol:トリル基、DMTr:ジメトキシトリチル基

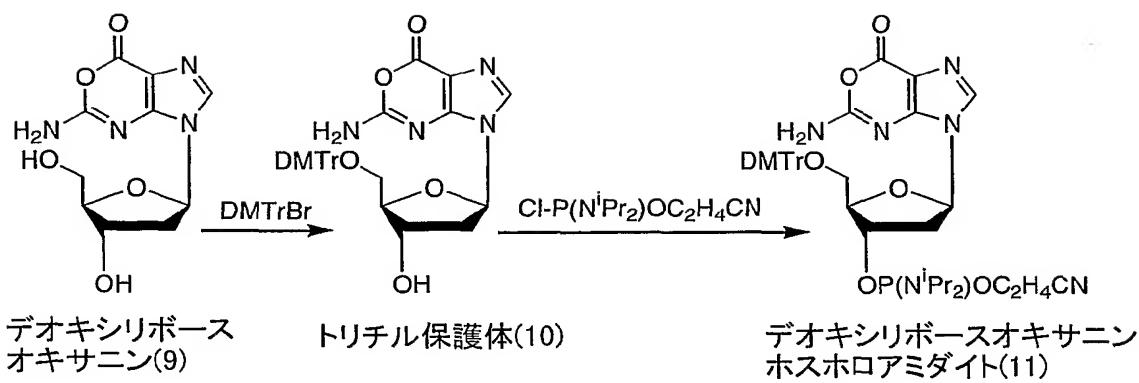
(2) グアニン誘導体（デオキシリボースオキサニン）ホスホロアミダイトの合成；

デオキシリボースを糖部分に有するオキサノシンは文献 (Tetrahedron Letters 24, 931(1983)) 記載の方法に従って合成する。



このデオキシリボースオキサニン (0.5g) (化合物 9) を無水ピリジンで減圧下共沸脱水した後、無水ピリジン (5ml) に溶解し臭化 4,4'-ジメトキシトリチル (0.6g) を加え 60°C で攪拌する。2 時間後加熱を止め、室温に戻してから水を加え、ジクロルメタン (5ml で 2 回) で抽出、乾燥、濃縮し残渣をトルエンで 2 回共沸し、ピリジンを完全に除く。トルエンを加え析出した結晶を洗浄し、減圧乾燥する事でトリチル保護体 (0.8g) (化合物 10) が得られる。

トリチル保護体 (0.7g) を、無水ピリジンと無水トルエンで各々 2 回減圧下共沸脱水した後、ジクロルメタン (5ml) に溶解し、ジイソプロピルエチルアミン (2.0ml) を加え 0°C に冷却し、クロロ-2-シアノエトキシジイソプロピルアミノホスフィン (1.0g) を加えて室温で攪拌する。1 時間後ジクロルメタン (5ml) を加え、5%重曹水溶液 (3ml) で 2 回洗浄、無水硫酸ソーダで乾燥、濃縮後残渣をシリカゲルクロマトグラフィーで精製してデオキシリボースオキサニンホスホロアミダイト (0.9g) (化合物 11) が得られる。



### (3) プローブの調製；

合成したシトシン誘導体ホスホロアミダイト（デオキシリボース-6-アザ-3-デアザシトシンホスホロアミダイト）化合物 8 及びグアニン誘導体ホスホロアミダイト（デオキシリボースオキサニンホスホロアミダイト）化合物 11 を用いてオリゴスクレオチドを合成する。オリゴスクレオチドの合成は P E バイオシステムズ社の自動合成機 DNA/RNA synthesizer (model394)を用いて行う。

### [実施例 2] ペプチド核酸の合成

#### (1) シトシン誘導体（化合物 15）の合成；

化合物 1 (2.2g)のメタノール(90ml)-ジメチルホルムアミド(90ml)懸濁液に水酸化ナトリウム(0.604g)、10%パラジウム炭素(0.9g)を加え、水素ガス置換下、常圧で 7 日間攪拌する。パラジウム炭素を濾過し、反応溶媒を減圧留去する。得られた残渣を精製水で再結晶して化合物 2 (0.835g)を得る。

化合物 2(1.0g)の無水ピリジン(50ml)懸濁液を、水浴で冷却し、アルゴンガス置換下、塩化ベンゾイル(2.09ml)を滴下する。アルゴンガス置換下、室温で 1 日攪拌した後、反応溶媒を減圧留去する。得られた残渣に精製水(10ml)を加え、4M 塩酸で pH1 に調整する。析出結晶をろ取し、精製水で洗浄する。減圧乾燥後、その結晶に無水エタノール(10ml)を加え、10 分間程煮沸する。10°Cまで冷却した後、結晶をろ取し、エーテルで洗い、化合物 3(1.399g)を得る。

化合物 3(1.00g)と炭酸カリウム(0.70g)のジメチルホルムアミド(12.9ml)懸濁液にプロモ酢酸メチル(0.48ml)を加え、アルゴンガス置換下、室温で 2 日間攪拌する。

不溶物をろ去し、ろ液の反応溶媒を減圧留去する。得られた残渣に精製水(4.5ml)を加えた後、氷浴下、4M 塩酸(0.175ml)を加え、15 分間攪拌する。結晶をろ取し、精製水で洗い、メチルエステル（化合物 12）を得る。この化合物 12 に精製水(6.75ml)と 2M 水酸化ナトリウム(3.38ml)を加え、30 分間攪拌する。この反応液を 0°C に冷やした後、不溶物をろ去する。得られたろ液に 4M 塩酸(1.97ml)を加え、析出結晶をろ取する。この析出結晶をメタノールで再結晶し化合物 13(0.779g)を得る。化合物 13(0.601g)、

ter-Butyl N-[2-(N-9-fluorenylmethoxycarbonyl)aminoethyl]glycinate(1.047g)、HOBt(0.337g) 及び DIEA (0.766 ml) の DMF (20 ml) 溶液に TBTU (0.706 g) を加え室温で 12 時間攪拌する。反応溶媒を減圧留去したのち残渣にジクロロメタン (150 ml) を加え、精製水 (100 ml x 3)、4 % 炭酸水素ナトリウム水溶液 (100 ml x 3)、4 % 硫酸水素カリウム水溶液 (100 ml x 3)、精製水 (100 ml x 3) で順次洗浄する。ジクロロメタン層を硫酸マグネシウムで乾燥後、減圧留去し得られた結晶を酢酸エチル-n-ヘキサンの混液で再結晶し化合物 14 (1.31 g) を得る。

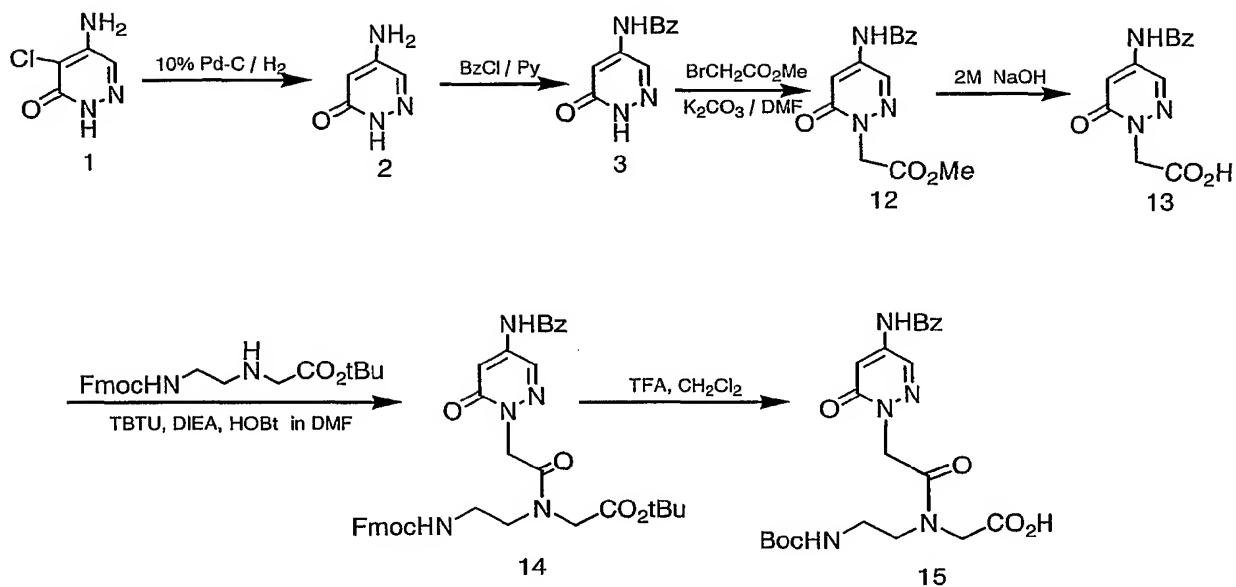
化合物 14 (0.30 g) をジクロロメタン (3 ml) と TFA (4 ml) の混液に加え 0 °C で 30 分間攪拌後、室温でさらに 3 時間攪拌する。反応溶媒を減圧留去したのちドライエーテル (5 ml) を加え析出した結晶を酢酸エチル-n-ヘキサンの混合溶媒で再結晶し化合物 15(0.256 g) を得る。

DIEA: diisopropylethylamine

TFA: trifluoroacetic acid

HOBt: 1-hydroxy-1H-benzotriazole

TBTU: 2-(1H-benzotriazole-1-yl)-1, 1, 3, 3-tetramethyluronium tetrafluoroborate



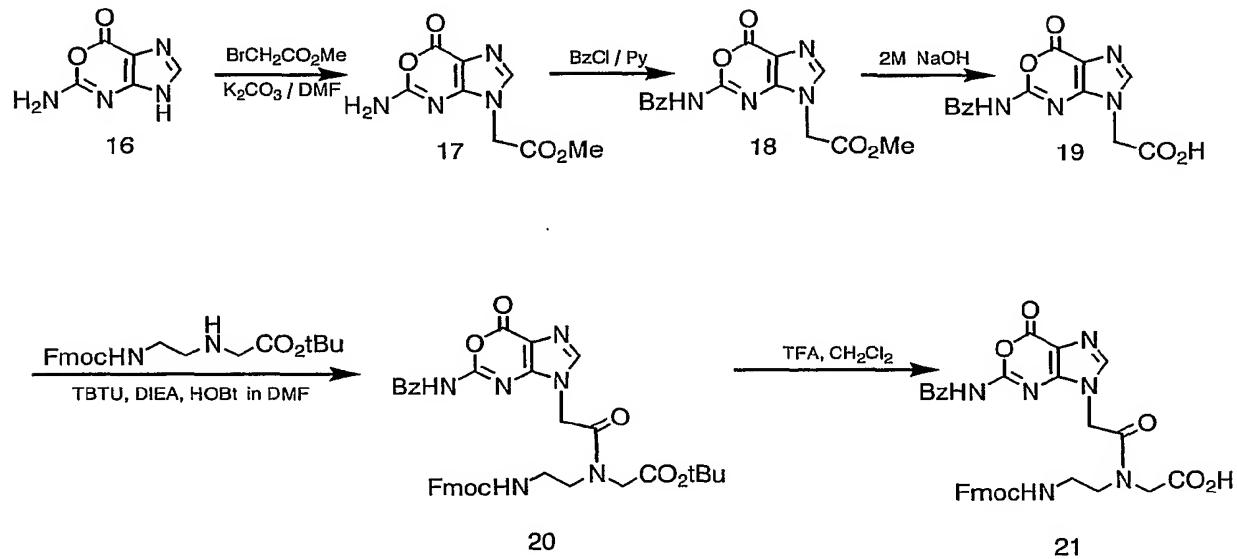
(2) グアニン誘導体（化合物 21）の合成；

5-amino-3H-imidazo[4,5-d][1,3]oxazin-7-one 16 と炭酸カリウムのジメチルホルムアミド懸濁液にプロム酢酸メチルを加え、アルゴンガス置換下、室温で 24 時間攪拌する。不溶物をろ去し、ろ液の反応溶媒を減圧留去した。得られた残渣に精製水を加え析出結晶をろ取したのちジメチルホルムアミドーエタノールの混合溶媒で再結晶しメチルエステル（化合物 17）を得る。

化合物 17 の無水ピリジン懸濁液を、水浴で冷却し、アルゴンガス置換下、ベンゾイルクロライドを滴下する。アルゴンガス置換下、室温で 1 日攪拌した後、反応溶媒を減圧留去する。得られた残渣に精製水を加え、氷浴下 1M 塩酸水溶液で pH1 に調整する。析出結晶をろ取し、ジメチルホルムアミドーエタノールの混合溶媒で再結晶して化合物 18 を得る。

化合物 18 を 2M 水酸化ナトリウム水溶液に加え、30 分間攪拌する。この反応液を 0°C に冷やした後、不溶物をろ去する。氷浴下得られたろ液を 4M 塩酸水溶液を加え pH 3 とし、析出結晶をろ取する。この析出結晶をジメチルホルムアミドーエタノールの混合溶媒で再結晶し化合物 19 を得る。化合物 19、ter-Butyl N-[2-(N-9-fluorenylmethoxycarbonyl)aminoethyl]glycinate、HOEt 及び DIEA の DMF 溶液に TBTU を加え室温で 12 時間攪拌する。反応溶媒を減圧留去したのち残渣にジクロロメタン (200 ml) を加え、精製水 (100 ml x 3)、4 % 炭酸水

素ナトリウム水溶液 (100 ml x 3)、4 % 硫酸水素カリウム水溶液 (100 ml x 3)、精製水 (100 ml x 3)で順次洗浄する。ジクロロメタン層を硫酸マグネシウムで乾燥後、減圧留去し得られた結晶をエタノール-n-ヘキサンの混合溶媒で再結晶し化合物 20 を得る。化合物 20 をジクロロメタンと TFA の混液に加え 0 ℃で 30 分間攪拌後、室温でさらに 3 時間攪拌する。反応溶媒を減圧留去したのちドライエーテル (5 ml) を加え析出した結晶をエタノール-n-ヘキサンの混合溶媒で再結晶し化合物 21 を得る。



### (3) プローブの調製；

化合物 15 及び化合物 21 を用いてオリゴペプチド核酸を合成する。オリゴペプチド核酸の合成は東京理化器械社の手動式パーソナル有機合成装置 CCS-600V を用いて行う。

#### [実施例 3] (ハイブリダイゼーション)

##### 【核酸型プローブ；シトシン誘導体及びグアニン誘導体】

オリゴ DNA 2種（オリゴ DNA A 及び DNA B）において、6-アザ-3-デアザシトシンをシトシンの代わりに、オキサニンをグアニンの代わりに用いて、それぞ

れに対応するオリゴDNA（A' 及びB'）を作製する。

オリゴDNA A及びBよりもGC含量の低いオリゴDNA Eを作製した。オリゴDNA Eにおいて、6-アザ-3-デアザシトシンをシトシンの代わりに、オキサニンをグアニンの代わりに用いたオリゴDNA E'を作製する。

また、オリゴDNA Eに相補的なオリゴDNA Fを作製する。

オリゴDNA A	:	atgccacgctatccgatgcc
オリゴDNA A'	:	ateddadedtatddeatedd
オリゴDNA B	:	atgcgacggtatcggatgcg
オリゴDNA B'	:	atedeadeetatdeeatede
オリゴDNA C	:	ggcatcgatagcgtggcat
オリゴDNA D	:	cgcattcgataccgtcgcat
オリゴDNA E	:	atgacactgtatccaatgac
オリゴDNA E'	:	ateadadadtatddaaatead
オリゴDNA F	:	gtcattggatacagtgtcat

(a, t, c, g はそれぞれアデニン、チミン、シトシン、グアニンを表す。d は 6-アザ-3-デアザシトシンを表す。e はオキサニンを表す。)

紫外吸収を測定により、オリゴDNA A'（6-アザ-3-デアザシトシン及びオキサニン置換DNA）／オリゴDNA Cの二本鎖DNAの融解温度を調べると、オリゴDNA A／オリゴDNA Cのそれに比べて低下していることが分かる。オリゴDNA B'／オリゴDNA Dの二本鎖DNAの融解温度も、オリゴDNA B／オリゴDNA Dのそれに比べて低下していることが分かる。オリゴDNA A'／オリゴDNA Cの二本鎖DNAとオリゴDNA B'／オリゴDNA Dの二本鎖DNAの融解温度は同程度であることが分かる。

オリゴDNA E'（6-アザ-3-デアザシトシン及びオキサニン置換DNA）／オリゴDNA Fの二本鎖DNAの融解温度は、オリゴDNA E／オリゴDNA Fの二本鎖DNAのそれに比べて低下していることが分かる。また、オリゴDNA A'／オリゴDNA Cの二本鎖DNAは、オリゴDNA B'／オリゴDNA Dの二本鎖DNA

と比較し、GC 含量が大きく異なるにも関わらず、融解温度は、同程度であることが分かる。

#### 【ペプチド核酸；シトシン誘導体及びグアニン誘導体】

オリゴペプチド核酸 2 種（オリゴペプチド核酸 A 及び B）において、6-アザ-3-デアザシトシンをシトシンの代わりに、オキサニンをグアニンの代わりに用いて、それぞれに対応するオリゴペプチド核酸（A' 及び B'）を作製する。

オリゴペプチド核酸 A 及び B よりも GC 含量の低いオリゴペプチド核酸 E を作製する。オリゴペプチド核酸 E において、6-アザ-3-デアザシトシンをシトシンの代わりに、オキサニンをグアニンの代わりに用いたオリゴペプチド核酸 E' を作製する。

また、オリゴペプチド核酸 E に相補的なオリゴ DNA F を作製する。

オリゴペプチド核酸 A	: atgccacgctatccgatgcc
オリゴペプチド核酸 A'	: ateddadedtatddeateddd
オリゴペプチド核酸 B	: atgcgacggtatcggtatgcg
オリゴペプチド核酸 B'	: atedeadeetatdeeatede
オリゴ DNA C	: ggcatcgatagcgtggcat
オリゴ DNA D	: cgcatccgataccgtcgcat
オリゴペプチド核酸 E	: atgacactgtatccaatgac
オリゴペプチド核酸 E'	: ateadaadtetatddaatead
オリゴ DNA F	: gtcattggatacagtgtcat

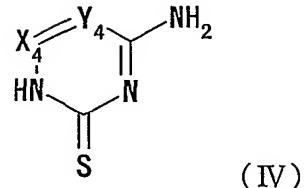
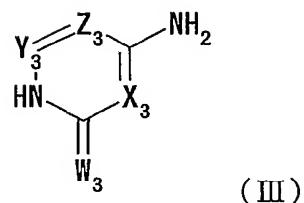
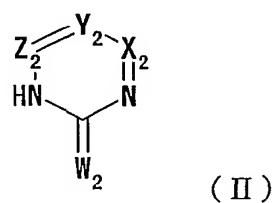
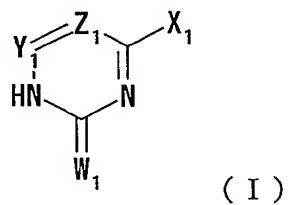
（a, t, c, g はそれぞれアデニン、チミン、シトシン、グアニンを表す。d は 6-アザ-3-デアザシトシンを表す。e はオキサニンを表す。）

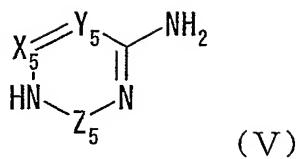
紫外吸収測定により、オリゴペプチド核酸 A'（6-アザ-3-デアザシトシン及びオキサニン置換ペプチド核酸）／オリゴ DNA C の二本鎖の融解温度を調べたところ、オリゴペプチド核酸 A／オリゴ DNA C のそれに比べて低下していることが分かる。オリゴペプチド核酸 B／オリゴ DNA D の二本鎖の融解温度も、オリ

ゴペプチド核酸 B' / オリゴ DNA D のそれに比べて低下していることが分かる。  
オリゴペプチド核酸 A' / オリゴ DNA C の二本鎖とオリゴペプチド核酸 B'  
/ オリゴ DNA D の二本鎖の融解温度は同程度であることが分かる。  
オリゴペプチド核酸 E' (6-アザ-3-デアザシトシン及びオキサニン置換ペプチド  
核酸) / オリゴ DNA F の二本鎖の融解温度は、オリゴペプチド核酸 E / オリゴ  
DNA F の二本鎖のそれに比べて低下する。また、オリゴ DNA A' / オリゴ DNA  
C の二本鎖 DNA は、オリゴ DNA B' / オリゴ DNA D の二本鎖 DNA と比較  
し、GC 含量が大きく異なるにも関わらず、融解温度は、同程度であることが分  
かる。

## 請 求 の 範 囲

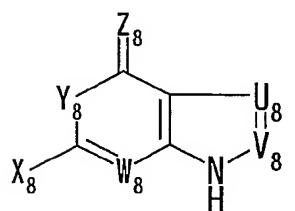
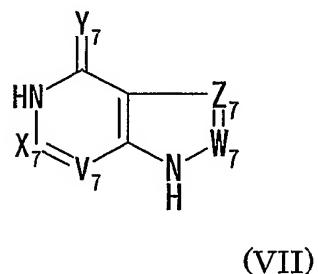
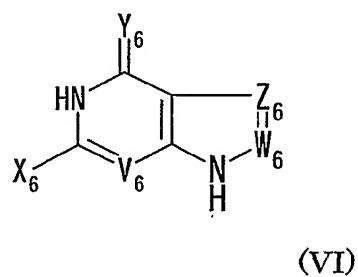
1. グアニン塩基と特異的に二本の水素結合を形成しうるシトシン誘導体、及びシトシン塩基と特異的に二本の水素結合を形成しうるグアニン誘導体を含むプローブであって、天然型核酸とのハイブリダイゼーション反応の際に、該プローブにおける実質上すべての塩基が二本の水素結合を形成しうるプローブ。
2. シトシン誘導体が、以下の式 (I) ~ (V) のいずれかの式で表される化合物であり、且つ、

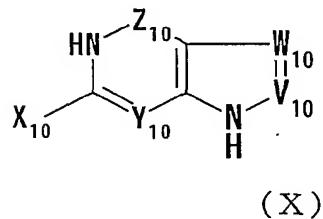
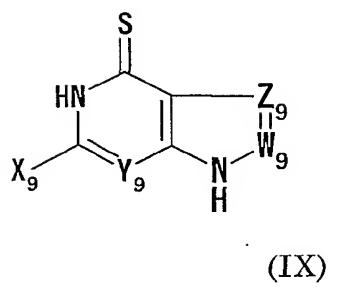




(式中、 $\text{X}_1$ は $\text{NR}_2$ 、 $\text{NHAc}$ 、 $\text{R}$ 、 $\text{OR}$ 、 $\text{OAc}$ 、 $\text{SR}$ 、 $\text{SAC}$ 、 $\text{COR}$ 、 $\text{COOR}$ 、 $\text{CN}$ 、 $\text{F}$ 、 $\text{Cl}$ 、 $\text{Br}$ 、又は $\text{I}$ を表し、 $\text{W}_1$ 、 $\text{W}_2$ 、及び $\text{W}_3$ は $\text{O}$ 、又は $\text{NH}$ を表し、 $\text{X}_3$ は $\text{CH}$ 、又は $\text{CR}$ を表し、 $\text{Z}_5$ は $\text{CH}_2$ 、又は $\text{CHR}$ を表し、 $\text{Y}_1$ 、 $\text{Z}_1$ 、 $\text{X}_2$ 、 $\text{Y}_2$ 、 $\text{Z}_2$ 、 $\text{Y}_3$ 、 $\text{Z}_3$ 、 $\text{X}_4$ 、 $\text{Y}_4$ 、 $\text{X}_5$ 、及び $\text{Y}_5$ は $\text{CH}$ 、 $\text{CR}$ 、又は $\text{N}$ を表す。但し、 $\text{R}$ はシトシン誘導体とグアニンとの間の2本の水素結合を阻害しない置換基を表す。)

グアニン誘導体が、以下の式VI～Xのいずれかの式で表される化合物である請求の範囲第1項記載のプローブ。





(式中、 $X_6$ 、及び $X_8$ は $NR_2$ 、 $NHAc$ 、 $R$ 、 $OR$ 、 $OAc$ 、 $SR$ 、 $SAc$ 、 $COR$ 、 $COOR$ 、 $CN$ 、 $F$ 、 $Cl$ 、 $Br$ 、又は $I$ を表し、 $Y_6$ 、 $Y_7$ 、及び $Z_8$ は $O$ 、又は $NH$ を表し、 $Y_8$ 、及び $Z_{10}$ は $CH_2$ 、 $CHR$ 、 $O$ 、又は $S$ を表し、 $X_9$ 、及び $X_{10}$ は $NH_2$ 、又は $OH$ を表し、 $V_6$ 、 $W_6$ 、 $Z_6$ 、 $V_7$ 、 $W_7$ 、 $X_7$ 、 $Z_7$ 、 $U_8$ 、 $V_8$ 、 $W_8$ 、 $W_9$ 、 $Y_9$ 、 $Z_9$ 、 $V_{10}$ 、 $W_{10}$ 、及び $Y_{10}$ は $CH$ 、 $CR$ 、又は $N$ を表す。但し、 $R$ はシトシンとグアニン誘導体との間の2本の水素結合を阻害しない置換基を表す。)

3. プローブの主鎖がデオシキリボースリン酸エステル鎖である請求の範囲第1及び2項記載のプローブ。

4. プローブの主鎖がペプチド鎖である請求の範囲第1及び2項記載のプローブ。

5. すべてのプローブが請求の範囲第1～4項に記載されたプローブから選ばれているプローブセット。

6. 請求の範囲第5項に記載されたプローブセットを含むプローブ固定化担体。

7. 請求の範囲第5項に記載されたプローブセットを含むDNAチップ。

8. 請求の範囲第5項に記載されたプローブセット、請求の範囲第6項に記載さ

れたプローブ固定化担体、又は請求の範囲第7項に記載されたDNAチップを用いるハイブリダイゼーション方法。

9. 請求の範囲第8項に記載されたハイブリダイゼーション方法を用いたSNP解析方法。

10. 請求の範囲第8項に記載されたハイブリダイゼーション方法を用いたDNA塩基配列決定方法

## SEQUENCE LISTING

<110> MITSUBISHI RAYON CO., LTD.  
GENOX RESEARCH, INC.

<120> A PROBE FOR HYBRIDIZATION

<130> PH-1221-PCT

<150>

<151>

<160> 6

<170> PatentIn version 2.0

<210> 1

<211> 20

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<400> 1

atgccacgct atccgatgcc

20

<210> 2

<211> 20

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<400> 2

atnnnnannnt atnnnnatnnn

20

<210> 3

<211> 20

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<400> 3

atgcgacggt atcggatgcg

20

<210> 4

<211> 20

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<400> 4

atnnnnannnt atnnnnatnnn

20

<210> 5

<211> 20

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<400> 5

ggcatcgat agcgtggcat

20

<210> 6

<211> 20

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<400> 6

cgcacccgat accgtcgcat

20

<210> 7

<211> 20

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<400> 7

atgacactgt atccaatgac

<210> 8

<211> 20

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<400> 8

atnanantn atnnaatnan

<210> 9

<211> 20

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<400> 9

gtcattggat acagtgtcat

**INTERNATIONAL SEARCH REPORT**

International application No.

PCT/JP01/03322

**A. CLASSIFICATION OF SUBJECT MATTER**

Int.Cl<sup>7</sup> C12Q1/68, C07D237/22, C07D498/04, C07H19/04, C07H19/24, C07H21/04

According to International Patent Classification (IPC) or to both national classification and IPC

**B. FIELDS SEARCHED**

Minimum documentation searched (classification system followed by classification symbols)

Int.Cl<sup>7</sup> C12Q1/68, C07D237/11, C07D498/04, C07H19/04, C07H19/24, C07H21/04

Documentation searched other than minimum documentation to the extent that such documents are included in the fields searched

Electronic data base consulted during the international search (name of data base and, where practicable, search terms used)

**C. DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT**

Category*	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
Y	WO, J. et al "G/C-modified oligodeoxynucleotides with selective complementarity: synthesis and hybridization properties" Nucleic Acids Research, Vol.24, No.13 (1996), pp.2470-2475	1-10
Y	WO, 97/12896, A1 (Epoch Pharmaceuticals, Inc.), 10 April, 1997 (10.04.97), Claims 4, 5; page 5 & US 5912340 A & JP 11-513388 A & AU 9672055 A	1-10
Y	JP 11-113571 A (Mitsubishi Chemical Corporation), 27 April, 1999 (27.04.99), Par. Nos. [0008], [0004]	1-10

Further documents are listed in the continuation of Box C.

See patent family annex.

* Special categories of cited documents:	
"A"	document defining the general state of the art which is not considered to be of particular relevance
"E"	earlier document but published on or after the international filing date
"L"	document which may throw doubts on priority claim(s) or which is cited to establish the publication date of another citation or other special reason (as specified)
"O"	document referring to an oral disclosure, use, exhibition or other means
"P"	document published prior to the international filing date but later than the priority date claimed
"T"	later document published after the international filing date or priority date and not in conflict with the application but cited to understand the principle or theory underlying the invention
"X"	document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered novel or cannot be considered to involve an inventive step when the document is taken alone
"Y"	document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered to involve an inventive step when the document is combined with one or more other such documents, such combination being obvious to a person skilled in the art
"&"	document member of the same patent family

Date of the actual completion of the international search 23 May, 2001 (23.05.01)	Date of mailing of the international search report 05 June, 2001 (05.06.01)
Name and mailing address of the ISA/ Japanese Patent Office	Authorized officer
Facsimile No.	Telephone No.

## A. 発明の属する分野の分類(国際特許分類(IPC))

Int. C17 C12Q1/68, C07D237/22, C07D498/04, C07H19/04,  
C07H19/24, C07H21/04

## B. 調査を行った分野

## 調査を行った最小限資料(国際特許分類(IPC))

Int. C17 C12Q1/68, C07D237/22, C07D498/04, C07H19/04,  
C07H19/24, C07H21/04

最小限資料以外の資料で調査を行った分野に含まれるもの

国際調査で使用した電子データベース(データベースの名称、調査に使用した用語)

## C. 関連すると認められる文献

引用文献の カテゴリー*	引用文献名 及び一部の箇所が関連するときは、その関連する箇所の表示	関連する 請求の範囲の番号
Y	WO, J. et al "G/C-modified oligodeoxynucleotides with selective complementarity: synthesis and hybridization properties" Nucleic Acids Research, Vol. 24, No. 13 (1996) p. 2470-2475	1-10
Y	WO, 97/12896, A1 (EPOCH PHARMACEUTICALS, INC.) 10.4月. 1997 (10.04.97) 請求項 4, 5, 第5頁 &US, 5912340, A&JP, 11-513388, A&AU, 9672055, A	1-10

C欄の続きにも文献が列挙されている。

パテントファミリーに関する別紙を参照。

## \* 引用文献のカテゴリー

- 「A」特に関連のある文献ではなく、一般的技術水準を示すもの
- 「E」国際出願日前の出願または特許であるが、国際出願日以後に公表されたもの
- 「L」優先権主張に疑義を提起する文献又は他の文献の発行日若しくは他の特別な理由を確立するために引用する文献(理由を付す)
- 「O」口頭による開示、使用、展示等に言及する文献
- 「P」国際出願日前で、かつ優先権の主張の基礎となる出願

## の日の後に公表された文献

- 「T」国際出願日又は優先日後に公表された文献であって出願と矛盾するものではなく、発明の原理又は理論の理解のために引用するもの
- 「X」特に関連のある文献であって、当該文献のみで発明の新規性又は進歩性がないと考えられるもの
- 「Y」特に関連のある文献であって、当該文献と他の1以上の文献との、当業者にとって自明である組合せによって進歩性がないと考えられるもの
- 「&」同一パテントファミリー文献

国際調査を完了した日

23.05.01

国際調査報告の発送日

05.06.01

国際調査機関の名称及びあて先

日本国特許庁 (ISA/JP)

郵便番号 100-8915

東京都千代田区霞が関三丁目4番3号

特許庁審査官(権限のある職員)

山村 祥子



4N 9217

電話番号 03-3581-1101 内線 3488

C (続き) . 関連すると認められる文献		
引用文献の カテゴリー*	引用文献名 及び一部の箇所が関連するときは、その関連する箇所の表示	関連する 請求の範囲の番号
Y	JP, 11-113571, A (三菱化学株式会社) 27.4月.1999(27.04.99) 【0008】 , 【0004】 (ファミリーなし)	1-10